

从 2-甲基 2,4 戊二醇中结晶出 CaM, 结晶属三斜晶系, 空间群 P1, $a = 29.79 \text{ \AA}$, $b = 53.74 \text{ \AA}$, $c = 24.78 \text{ \AA}$; α 、 β 、 γ 分别为 93.46° , 96.98° ,

89.05° ; 每个晶胞含一个 CaM 分子, X 射线衍射分辨率超过 $2.5 \text{ \AA}^{[10]}$ 。

〔待续〕

环糊精在生化研究、农业、药物及食品加工中的应用

芮海凤

(中国科学院环境化学研究所, 北京)

鉴于环糊精 (Cyclodextrin, CD) 的特殊结构(图 1) 和性质^[1], CD 应用范围日益广泛。现就它在生化研究、农业、药物、食品方面的应用, 介绍如下。

一、CD 在模拟酶方面的应用

1. CD 自身的酶学性质

α -CD 可模拟水解酶催化水解三氟乙酰替苯胺^[2], 是经 CD 的二级氢氧离子(O^-)亲核进攻包接在 CD 腔内的 C_1 原子, 产生一个四面体中间物, 再经乙酰化和脱乙酰化而完成。

以 β -CD 为合成酶模型, 包接 2-甲基萘氢醌已合成了维生素 K 类似物^[4]。反应过程是把烯丙基溴加到包接物溶液中, 同时加入极少量的氧气, 使自发地烯丙基化, 随后控制氧化即可(反应式 1)。

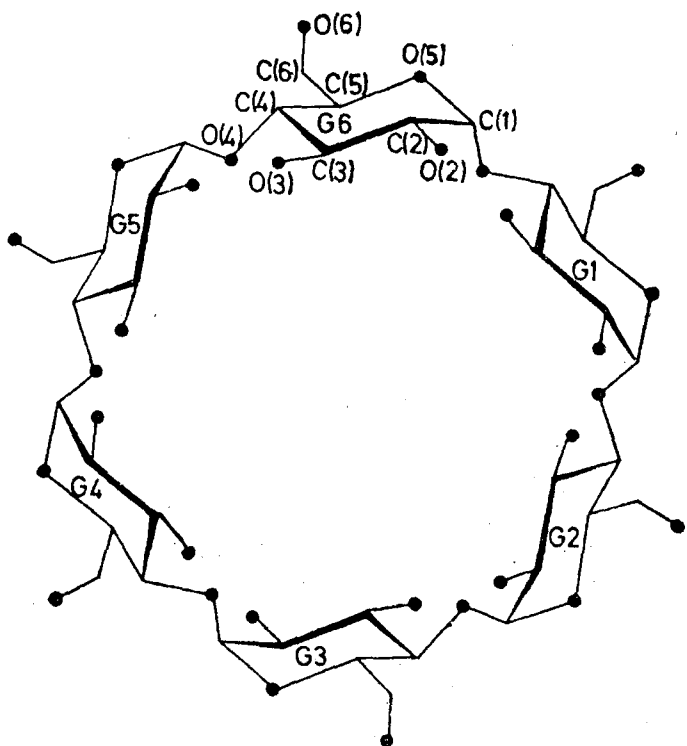
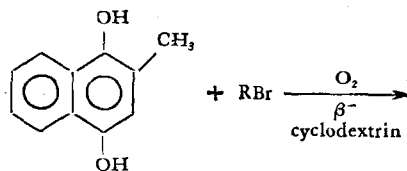
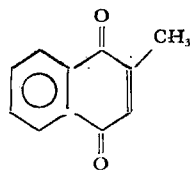
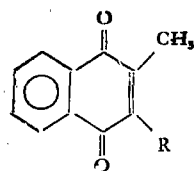


图 1 α -CD 的化学结构^[2]



(1)

- a, $R = -CH_2CH=CH_2$; b, $R = -CH_2CH=CHCH_3$;
c, $R = -CH_2C(CH_3)=CH_2$; d, $R = -CH_2CH=C(CH_3)_2$

β -CD 模拟裂解酶(反应途径控制)溶剂分解 β -溴乙基-1-萘^[5]。在不加 β -CD 的情况下,得到的产物分配符合反应机理 S_N1 、 S_N2 、 E_1 和 E_2 之间的竞争规律。在强碱条件下,优势成分是消除产物。而加有 β -CD 的情况下,反应有如下特征:

- a, 速率显著增高;
b, 速度常数随着 CD 的浓度增加而提高,最终达到饱和;
c, 所得产物几乎全是消除产物(II)(图 2)。

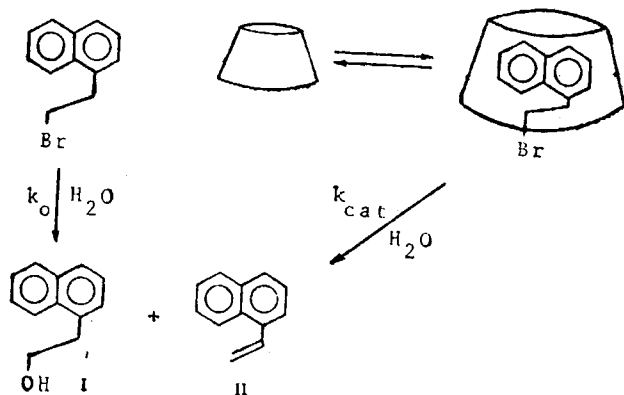


图 2 β -溴乙基-1-萘的分解反应

在溶剂分解作用中, CD 使得 E 反应(尤其 E_2)显著加快,同时 S_N2 反应明显减慢。这些事实有力地表明,显著的反应途径控制是由于大大加速了 E_2 反应。这很可能是经历了一个非常适当的酸碱匹配的催化过程(图 3)。

2. 经修饰的 CD 作为酶模型

尽管 CD 具有独特的类似酶的识别能力和催化特性,但 CD 只有有限的疏水表面区域和催化活性。经帽式修饰后再引入有效的功能团就能弥补此种缺陷(图 4)。

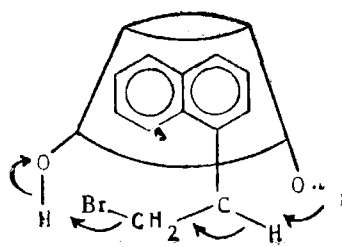


图 3



图 4 帽式 CD

在天然酶机理方面经常遇到双功能催化位点。由帽式 CD 制备可得到部分选择性双功能 CD, 它既有一个疏水识别位点, 又有一个双功能催化位点 ($X \cdots Y$)^[6] (图 5)。

CD-萘酰胺复合物作为脱氢酶模型^[6]。CD-二氢萘酰胺复合物(Id)对水合茚三酮的催化速率是单体辅酶 NADH 的 40 倍,其原因可能是邻近效应的作用,与形成四面体复合物有关。



图 5 双功能 CD

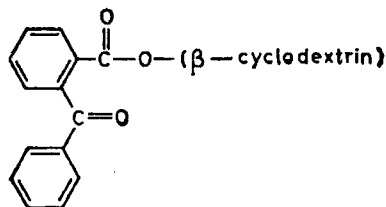


图 6

在 β -CD 上连接一个苯酰苯酯(图 6),可作为一个良好的电子受体,用于模拟氧化还原酶。Carmen Z. Smith 等观察到其中一个电子因还原而产生的单向扫描速率高达 $300V/S^{77}$ 。

Breslow 发现提高催化活性的理想途径是金属配位,在 CD 上直接接上一个非常有效的催化基团(nickel oximate)(图 7)。这样一个酶带着二个不相关的识别位点^[4],我们称之为“双识别”。

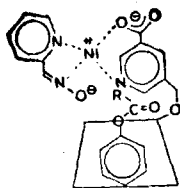


图 7

3. 模拟三识别连接酶——“双 CD”^[8]

更好的酶模型是三识别体系。三识别是模拟连接酶活性的起码条件。

一个具有三识别的主体分子是“双 CD”(图 8)。双 CD 有二个疏水键合位点(HP₁ 和 HP₂, 图 9)和另一个识别元 C (element C) 专一键合甲基橙——一个带着二个疏水识别元的客体染料分子。



图 8 双 CD

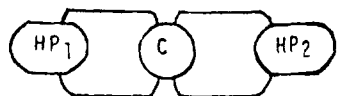


图 9 三识别的连接酶

HP₁、HP₂, 疏水识别位点; C, 另一个识别元(酸、碱、金属等)

二、形成分子包裹——使活性成分以分子分散形式包接在 CD 内

黄菊油-β-CD 复合物提高了黄菊油对热和氧的稳定性,甚至于真空 150℃ 或纯氧 37℃ 下也不发生大量的分解。极易变性的维生素 D₃ 与 β-CD 复合后,对热、氧、光的稳定性要比纯维生素 D₃ 高得多。前列腺素 I₂, F_{2α}, E₂ 和 E₁ 与 β-CD 的复合物也具有类似的优点。同样,用 β-CD 包接除虫菊酯可形成一性能稳定的粉剂,施用后长期保持杀虫毒性。挥发性农药 DDVP 不稳定,包接在 β-CD 内就不受光和大气的影响。茴香脑用 β-CD 包接后对氧的反应钝化了。洋葱、莳萝、蒜、黄蒿、辣椒和芥菜所含芳香油包接在 β-CD 内,成为粉剂而保持稳定^[9]。香草醛-β-CD 复合物能使芳香物质保留时间延长,薄荷-CD 复合物使口香糖香味可长时间保持浓郁^[10]。添加 β-CD 的饼干低温下贮存二个月仍有奶油味。β-CD 与不同量的佛手柑、茉莉、柠檬和薄荷混合后掺入茶叶中,可以改善劣质茶的质量。CD 包络能使烟草中的芳香物质不挥发,抽用时才释放。薄

荷醇香烟中的薄荷醇能用 β-CD 复合物形式被固定。尼古丁也能与 β-CD 生成结晶状复合物,所以 β-CD 可用于制造香烟滤咀;用 β-CD 处理过的纤维膜可除去卷烟的大部分尼古丁和烟油(tar)。由粗 CD 的反应混合物制备的 CD 聚合物也能用于制造滤咀,此种滤咀的前后各三分之一是醋酸纤维,中间是 CD 聚合物^[11]。

用 CD 或它们的复合物也能配制固体香料、香味蜡烛、乳剂性化妆品、固色剂、浴水添加剂和牙膏等^[10]。

三、用于分子改性

因为 CD 腔的大小不同,可以使得客体获得选择性催化的能力。

苯唑卡因、普鲁卡因、阿托品、阿斯匹林、苯基丁氮酮、水杨酸、驱蛔脑、环戊烯[2]-十三(烷)酸乙酯和油酸,经 β-CD 包接后,抑制它们在水溶液中降解,而氮杂和杀虫剂 trichlorophone 经 β-CD 包接后加速了降解。β-CD 包接前列腺素 A₁ 提高了它的官能团的选择性,从而异构成前列腺素 B₁;同样,也促进 2-氯-10-(3-二甲氨基丙基)酚噻嗪脱氯。蒜素、抗菌素、抗真菌素的有害气味,以及大蒜的不稳定活性物质都可由 β-CD 包接而得到改善。

药物分子与 α-CD 或 β-CD 的羟基相互作用,使药物的溶解度增大,从而提高了药物的生物活性。

维生素 K-CD 复合物粉剂常常比单纯的维生素 K 易溶解^[9],洋地黄葡萄糖苷-CD 复合物增加了它的水溶性。

兔子和狗饲以抗高温药 flufenamic acid, ibuprofene, 和 ketoprofene 及其 β-CD 的包接物,结果表明以包接物形式饲以的药物在血和尿中出现较快。抗风湿药 indomethazine 与 β-CD 包接后并不加速它的作用,但能改善它的性质,它的溃疡生成性质几乎完全被抑制^[9]。兔子饲以经过 β-CD 包接的消炎痛,肠胃的副作用明显减少,同时生物效应提高,使得消炎痛在血液中的含量提高 25%^[13]。兔子服下游离态和 β-CD 包接态的 T-标记的硬脂酸和 ¹⁴C 标记的 icosatrienic acid, 然后测定在尿、血和淋巴中放射性的分布,表明经 CD 包接的比不包接的吸收快和有效得多^[9]。巴比妥经 β-CD 包接增强了它的安眠效力,用以饲喂的老鼠,睡觉时程缩短(由口服到失去正常反应的时间),睡觉时间延长^[14]。

用药过量时,药物能通过腹膜渗透而部分排掉。给兔子腹腔注射相当于体重 15% 的生理盐水或含 1.5% β-CD 的生理盐水,同时舌下动脉注射苯巴比妥(100 mg/公斤体重),然后定时取样测定表明,注射含 β-CD 溶液的巴比妥吸收量为不含 β-CD 溶液的三倍^[9]。

CD 带甜味,其味觉阈值比蔗糖稍低。同时加入食品中,二者甜度是加和的,因此含有低味觉阈值物质的

食品可以加入少量的 CD。新橙皮苷二氢查耳酮和柚苷中加入 β -CD 后苦味减少很多。在柠檬罐头中加入 CD 可以防止产生苦味的橙皮苷和柚苷沉淀,因此苦味随之减少。罐头竹笋在水中生成白色沉淀也可用加入 β -CD 来防止。增甜剂查耳酮和二氢查耳酮极易从软饮料中沉淀出来,冷冻状态沉淀尤其易生成,如加入 β -CD 即可避免^[11]。

牛奶酪蛋白水解物易消化,但有苦味;加入 10% β -CD 就能消除。人参抽提物、丙(撑)二醇的苦味也可用加入 CD 而消除。葡萄柚汁热处理后加入 0.3% β -CD,苦味可大大降低。羊肉和鱼的特殊气味、骨粉(动物饲料的钙源)、酵母抽提物、钠型酪蛋白溶液等的令人不快的气味,都可用加 CD 来除去。CD 还可除去豆制品的豆腥味。大豆卵磷脂与 β -CD 揉在一起制成无味粉剂可作为营养品。醋酸- β -CD 或碘- β -CD 复合物可作为去苦剂^[10]。酵母抽提物用 β -CD 处理后,可以改变颜色、降低吸湿性和去味。微生物如酪酸菌、乳酸菌或酵母,与 β -CD 混合后干燥,可得到无味细胞粉剂。食用鱼、大蒜等以后,可用 CD 作为口腔去味剂。

CD 及其复合物不吸湿的特性在高温高湿条件下显得尤其有用。软糖料和蔗糖与 β -CD-脂肪酸复合物混合,可防止潮解。加工肉类,可用 CD 改善产品的保水性和组织的完整性。玻璃纸用含有 CD 的粘胶剂粘合,可做香肠肠衣^[11]。

四、CD 用于分离提取

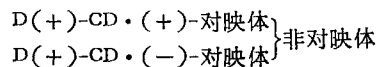
CD 聚合物是柱层析(凝胶包接色谱 gel inclusion chromatography)的一种良好的填充剂。与常规的 Sephadex 相比,CD 聚合物能有效吸附一定大小分子的优点,可分离分子量相近的分子、甚至异构体分子。如 β -CD 聚合物能从蛋白水解物中分离出苯丙氨酸;将芳香氨基酸与非芳香氨基酸分离出来,同时把苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸一个个分开^[12]。用二氰酸酯交联的 β -CD 聚酯树脂能将苯基甘氨酸、酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸完全分开^[16]。用它分离核苷和核苷酸,效果也很好。这是由于二者磷酸基团的位置不同,引起 pH 也不同,而 pH 可影响 CD 聚合物选择不同对象。Cr-ATP 复合物的非对映体在 CD 聚合物上分离也已取得成功。寡核苷酸、RNA 片断和完整的 tRNA 不能用 CD 聚合物分离,但只要引入了二乙胺乙基即可。因为引入的基团起了额外阴离子交换的作用。用 3-氯-1,2-环氧丙烷交联的可溶性 CD 树脂,对直链和支链石蜡有不同的亲合性,因此可分离两种石蜡。

连接有 CD 的聚合物可用于淀粉酶的亲和层析。它具有只是酶连接在 CD 上作为抑制剂而不在 CD 上进行酶反应的优点。例如,土豆中 β -淀粉酶在用 α -CD-Sepharcose 填充的柱中被吸附时,与其极相似的 α -淀粉酶却可通过;被吸附的 β -淀粉酶可用 α -CD 洗脱^[9]。

利用 α -CD 或 β -CD 作为离子交换液相色谱的固定相,可以迅速而灵敏地分离和测定前列腺素 E、A 和 B^[17]。

CD 聚合物含有旋光活性的 β -CD,可以通过包接色谱分离活性对映体。已有九个生物碱在 CD 聚合物凝胶柱上逐个被分离的报道^[18]。

CD 特别是 CD 聚合物有希望用来拆分外消旋物^[9]。由于 CD 本身是有旋光活性的分子,它们与每个包接的外消旋物形成一对非对映体,这二个非对映体表现出不同的物理性质:



如果用 5—10 倍过量的 CD 溶液与外消旋物混合,其中一个 CD·对映体优先沉淀出来,就引起部分的外消旋物拆分。这个现象用扁桃酸酯、苯氯酸酯、苯基乳酸酯、2,2'-和 4,4'-二氯安息香、二溴肉桂酸(2,3-二溴-3-苯丙酸)和二溴琥珀酸都得到证实。在这种情况下对映体纯度达到 3—10%。用 α -CD 和 β -CD 分离外消旋的异丙基甲基磷酸酯和它们的乙基类似物,产率很高,包接对映体的纯度可达 84%。手性亚硫酸酯化合物的外消旋体,如亚砷、亚磺酸酯、硫代亚磺酸酯,用 β -CD 包接后都能拆分成它们的对映体,在一步分离中对映体纯度达到 15% (异丙基甲基亚磺酸酯达到 68%)。

有人用(S)-(+)-和(R)-(-)-异丙基甲基氟代磷酸进行了 α -CD 对外消旋物的催化作用的研究,由于其中一个对映体被优先水解,结果也出现了部分的外消旋物拆分。

五、植物生长调节剂

CD 也可用来调节植物生长,提高谷类产量。用 β -CD 水溶液处理过的种子发芽推迟,这是由于一些降解种子淀粉粒的淀粉酶至少部分受到抑制。植物秧苗初期生长受抑制,后期就生长速度加快。大麦、春小麦、黑麦经处理后分蘖特征增强,结果提高了产量。蔬菜的种子如小萝卜、莴苣、欧芹处理后,不仅产量较高,而且提高了块茎中干物质含量^[19]。

植物生长调节剂 2-氯乙基磷酸(CEPA),施于植物上后渗透进入细胞,由于环境 pH 的影响使得 CEPA 迅速地释放出乙烯,以致于难以控制其生物效应。而 CEPA- α -CD 复合物可阻滞植物对 CEPA 的吸收和 CEPA 的分解,达到有控制的释放乙烯调节植物生长的目的^[20]。

参 考 文 献

- [1] Bander, M. L., et al.: *Cyclodextrin Chem.*, 1978.
- [2] Saenger, W.: *Jerusalem Symp. on Quantum Chem. and Biochem.*, 1975, 8th, 265.

- [3] Komiyama, M., et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **99**(24), 8021, 1977.
- [4] Iwao Tabushi: *Acc. Chem. Res.*, **15**, 66, 1982.
- [5] Iwao Tabushi: *Advances in Solution Chem.*, 1980, 5th ed., 221.
- [6] Kojima, M., et al.: *Tetrahedron Letters*, **21**(28), 2721, 1980.
- [7] Smith, C. Z., et al.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **15**, 792, 1981.
- [8] Iwao Tabushi, et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **101**(6), 1614, 1979.
- [9] Saenger, W.: *Angew. Chem.*, **19**(5), 344, 1980.
- [10] Szejtli, J.: *Proc. Int. Symp. Cyclodextrins*, 1st, 469, 1981.
- [11] Szejtli, J.: *Starch*, **34**(11), 379, 1982.
- [12] Lenkey, B.: *Proc. Int. Symp. Cyclodextrins*, 1st, 451, 1981.
- [13] Neumark, T., et al.: *ibid.*, 455, 1981.
- [14] Kyoko Koizumi, et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, **28**(1), 319, 1980.
- [15] Zsádon, B.: *Starch.*, **31**(1), 11, 1979.
- [16] Zsádon, B.: *J. Chromatography*, **208**(1), 35, 1981.
- [17] Uekama, K., et al.: *J. Pharm. Sci.*, **66**(5), 706, 1977.
- [18] Zsádon, B., et al.: *J. Chromatography*, **208**(1), 109, 1981.
- [19] Tétényi, P.: *Proc. Int. Symp. Cyclodextrins*, 1st, 501, 1981.
- [20] Tétényi, M.: *ibid.*, 519, 1981.

[本文于1983年11月21日收到]

从《国际生物膜和生物能讨论会》得到的信息

杨福愉

(中国科学院生物物理所)

1984年10月上旬由国际生物化学学会,国际生物物理学会和中国科学院共同赞助下在北京召开了一次〈国际生物膜和生物能讨论会与讲座〉。生物膜和生物能是当前分子生物学和细胞生物学研究一个十分活跃的领域。在我国召开这方面的国际学术讨论会还是第一次。来自美国,意大利,瑞士,日本等国家12位科学家参加了会议,其中包括国际生物能小组前任和现任主席 Fleischer 和 Papa 教授,诺贝尔奖金获得者 Palade 教授,国际著名生物能教授 Slater 和金祖怡教授等。国内研究生物膜和生物能的科学家和专家邹承鲁,杨福愉,林其谁,沈允钢,林克椿,刘树森,匡廷云等近80人也参加了会议。

虽然生物膜和生物能研究的范围很广,但通过这次规模不大的国际讨论会对有关当前这一领域的研究动向也提供不少信息。

生物能的研究

在生物能研究方面,有细胞能力站之称的线粒体内膜电子传递链的第III复合物(或称辅

酶Q-细胞色素c还原酶系)是大家研究兴趣比较集中的目标。这是可以理解的,因为,比较起来对电子传递链这一部分还是不够了解的。在这次国际讨论会上提出的有关论文包括:细胞色素b的三相还原,鸡心线粒体辅酶Q-细胞色素c还原酶的结构与定位,抗霉素A的结合动力学以及辅酶Q结合蛋白等等。此外,对胆碱脱氢酶,原核与真核细胞细胞色素c的比较研究等也分别进行了介绍。

对生物能转换的‘关键装置’—— H^+ -ATP酶复合体在脂质体上的重建以及它的活性部分(F_1)各亚单位之间的相互作用也都作了交流。

关于能量转换的偶联机理方面,既有继续支持 Mitchell 化学渗透假说的报告,也有提出对这一假说需要大大修改甚至取代的论点。1961年英国 Mitchell 提出的化学渗透假说认为跨膜的质子电化学梯度 $\Delta\mu_{H^+}$ 是能量转换的中间形式,这一假说由于得到了大量实验的支持因而使他获得了1978年的诺贝尔化学奖。但近年来不断报道与化学渗透假说相矛盾的实验结果,支持与不支持这一假说的争论愈趋尖锐。